

Trabajo de grado para aspirar al título de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Prevalencia de Influenza H5N6 en aves: Revisión sistemática y metaanálisis de otra
zoonosis emergente potencialmente pandémica

Delcy Cecilia Erazo Arana

Asesores:

Alfonso Javier Rodríguez Morales

Diana Katterine Bonilla Aldana

Universidad Tecnológica de Pereira

Facultad Ciencias de la Salud

Medicina Veterinaria y Zootecnia

Pereira

2020

Prevalencia de Influenza H5N6 en aves: Revisión sistemática y metaanálisis de otra zoonosis emergente potencialmente pandémica

Delcy Cecilia Erazo Arana^{1,2}, Alfonso J. Rodríguez Morales^{1,2,3,4}, D. Katterine Bonilla Aldana^{1,5}

¹Grupo y Semillero de Investigación y Salud Pública e Infección, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

²Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

³Co-Director Grupo y Semillero de Investigación en Salud Pública e Infección, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

⁴Investigador Senior MinCiencias, Colombia.

⁵Investigador Junior MinCiencias, Colombia.

Resumen

Introducción: Los AIV son virus de ARN segmentado de sentido negativo de una sola cadena clasificados en el género Alphainfluenzavirus de la familia Orthomyxoviridae. El gen de la hemaglutinina (HA) de los virus de la gripe aviar de alta patogenicidad (IAAP) A (H5) ha experimentado una evolución continua, generando subtipos y cepas consideradas emergentes. Entre estas variantes, dos clados relativamente nuevos, moldearon predominantemente la actual evolución viral y las expansiones transcontinentales. Es notable que los clados involucran múltiples subtipos, incluyendo H5N1, H5N2, H5N6, y H5N8, entre otros. Los (AIV) son responsables de una serie de enfermedades, la forma altamente patógena y zoonótica de los virus. Ellos suponen una amenaza sustancial tanto para la salud pública como para la salud animal. **Objetivos:** Determinar la prevalencia combinada de infección por virus Influenza H5N6 en aves. **Metodología:** Se realizó una revisión sistemática de la literatura en seis bases de datos internacionales (Web of Sciences, Scopus, PubMed, SciELO, Lilacs y Google Scholar) para evaluar la proporción de aves infectadas con el virus H5N6, por técnicas moleculares

y/o inmunológicas. Se realizó un meta-análisis utilizando un modelo de efectos aleatorios para calcular la prevalencia combinada y los intervalos de confianza del 95% (IC95%), además de la media de viremia combinada (IC95%). Se uso un nivel alfa del 5% de 2 colas para las pruebas de hipótesis. Se estimó y reportó medidas de heterogeneidad, incluida la estadística Q de Cochrane, el índice I^2 y la prueba de tau cuadrado. Los análisis de subgrupos se realizaron por clases de animales. **Resultados:** Se recuperaron 14.605 artículos (2015-2020). Después de la selección por resumen/título, se seleccionaron 37 artículos para la evaluación de texto completo y 15 se incluyeron para análisis cualitativos y cuantitativos. Del total ($n = 13,416$ aves), la prevalencia de la agrupación por RT-PCR fue del 3,5% (IC del 95% 2,8-4,3%), con un 39,67% evaluado en patos, en los cuales la prevalencia de la agrupación fue del 7,7% (IC del 95% 4,4-11,0). En pollos, la prevalencia de la agrupación fue del 3,3% (IC del 95%: 1,9-4,8). Vietnam fue el país con la prevalencia de grupo más alta, 7,9% (IC 95% 4,0-11,7%). **Conclusión:** Una proporción considerable de aves infectadas dio positivo, destacando la relevancia de los animales individuales como reservorios de H5N6. Se encontró que los patos y pollos eran positivos por RT-PCR en más del 3% de los casos; estos datos sugieren su relevancia en el mantenimiento de la transmisión zoonótica.

Palabras clave: Influenza; H5N6; Diagnóstico molecular; RT-PCR; Revisión sistemática; Meta-análisis.

Abstract

Introduction: AIVs are single-stranded, negative-sense RNA viruses classified in the genus Alphainfluenzavirus of the Orthomyxoviridae family. The hemagglutinin (HA) gene of highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) A (H5) has undergone continuous evolution, generating subtypes and strains considered emerging. Among these variants, two relatively new clades predominantly shaped current viral evolution and transcontinental expansions. It is notable that clades involve multiple subtypes, including H5N1, H5N2, H5N6, and H5N8, among others. (AIV) are responsible for a number of diseases, the highly pathogenic and zoonotic form of viruses. They pose a major threat to both public and animal health. Objectives: To determine the combined prevalence of H5N6 influenza virus infection in birds. **Methodology:** A systematic review of the literature was carried out in six international databases (Web of Sciences, Scopus, PubMed, SciELO, Lilacs and Google Scholar) to evaluate the proportion of birds infected with the H5N6 virus, by molecular techniques and / or Immunological A meta-analysis was performed using a random effects model to calculate the combined prevalence and 95% confidence intervals (95% CI), in addition to the means of combined viremia (95% CI). A 2-tailed 5% alpha level is used for hypothesis testing. Measures of heterogeneity were estimated and reported, including the Cochran Q statistic, the I^2 index and the tau square test. Subgroup analyzes are performed by animal class. **Results:** 14,605 articles were retrieved (2015-2020). After screening by abstract/title, 37 articles were selected for full-text assessment and 15 were included for qualitative and quantitative analyses. From the total (n=13,416 birds), the pool prevalence by RT-PCR was 3.5% (95%CI 2.8-4.3%), with 39.67% assessed in ducks, in which pool prevalence was 7.7% (95%CI 4.4-11.0). In chickens, the pool prevalence was 3.3% (95%CI 1.9-4.8). Vietnam was the country with the highest pool prevalence, 7.9% (95%CI 4.0-11.7%). **Conclusion:** A considerable proportion of infected birds tested positive, highlighting the relevance of individual animals as reservoirs of H5N6. Ducks and chickens were found to be positive by RT-PCR in over 3% of the cases; these data suggest their relevance in the maintenance of zoonotic transmission.

Keywords: Influenza; H5N6; Molecular diagnosis; RT-PCR; Systematic Review; Meta-Analysis.

Introducción

Los virus de la gripe aviar (AIV) pertenecen al género *Alphainfluenzavirus* en la familia *Orthomyxoviridae* (1). Se pueden clasificar en virus de influenza aviar de baja patogenicidad (LPAIV), con aves acuáticas como reservorios de hospedantes primarios; y virus de la influenza aviar altamente patógena (HPAIV), con las aves de corral como los principales reservorios del huésped (2). Estos virus pueden viajar largas distancias a través de aves acuáticas, llegar a granjas de pollos e infectar aves de corral ingenuas (3). Los HPAIV siguen siendo una amenaza subyacente para la salud y la economía mundial, ya que algunos de estos virus conllevan un riesgo potencial de pandemia (4-7).

H5N6, un subtipo de AIV, se aisló por primera vez de los patos silvestres en 1975 (8). Este virus ha evolucionado y reafirmado continuamente para generar nuevos HPAIV que han dado lugar a una serie de incidentes epidémicos: en 2014, Laos y Vietnam informaron brotes de A (H5N6) que mataron a cientos de aves (9), posiblemente importadas de aves de corral vivas de China (10). Ese mismo año, China reportó el primer caso fatal entre humanos (11). Hasta la fecha, 24 casos confirmados de infección humana con el virus de la influenza A (H5N6) han sido reportados a la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde China desde 2014, incluidas siete muertes (12).

Lo cierto es que, el virus de la influenza aviar (AIV) se encuentra en aves silvestres, en particular las pertenecientes a las órdenes Anseriformes (aves acuáticas, *es decir*, patos, gansos y cisnes) y Charadriiformes (gaviotas y aves playeras), por mucho tiempo se ha considerado como huéspedes y reservorios naturales para todos los virus de influenza tipo A (4). Dicho virus tiene el ARN segmentado de sentido negativo de una sola cadena clasificado en el género *Alphainfluenzavirus* de la familia *Orthomyxoviridae*. El gen de la hemaglutinina (HA) de los virus de la gripe aviar de alta patogenicidad (IAAP) A (H5) ha experimentado una evolución continua, generando subtipos reajustados emergentes, mencionando que los análisis de secuencia indicaron que este virus probablemente evolucionó de los virus H5N1 y H6N6 derivados de Eurasia a través de interacciones frecuentes entre aves silvestres y domésticas (5).

Se ha demostrado que varias combinaciones de virus H5nx influenza A (IAV) zoonótico, aumenta la preocupación mundial por la salud humana. Los linajes emergentes más recientes de preocupación son los altamente patógenos (HP) y/o zoonóticos de los AIV H5N6 en China y el sudeste asiático (6). Por otra parte, el virus H5N6 presenta manifestaciones clínicas, que afectan a la aves de corral, y su morbilidad y mortalidad son altas, pues el virus H5N6 causa infecciones del tracto respiratorio y digestivo, además de producir hemorragias internas, en cuanto a los humanos, los signos son de tipo respiratorio que se pueden complicar (7). En cuanto a su diagnóstico, las técnicas como PCR suele ser la herramienta fundamental para el diagnóstico definitivo, puesto que se enfoca en la observación específica del estudio genético (8).

Dado que las aves desempeñan un papel fundamental como huéspedes y reservorios naturales de este virus, necesitamos una comprensión más clara de la dinámica de transmisión de aves a humanos en entornos salvajes, urbanos y suburbanos. Por lo tanto, realizamos una revisión sistemática y un meta-análisis para sintetizar datos publicados previamente que evaluaron la infección por H1N6 en aves usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Materiales y métodos

Protocolo:

Este protocolo sigue las recomendaciones establecidas por la declaración PRISMA (13).

Criterios de elegibilidad: Se incluyeron artículos revisados por pares que informaron la infección por H5N6 en aves con confirmación serológica o molecular por RT-PCR. No se estableció el límite de idioma del artículo, e incluimos publicaciones desde el 1 de enero de 2002 hasta el 1 de abril de 2020, cuando finalizó la búsqueda. Los artículos de revisión, opinión y correspondencia que no presentan datos originales fueron excluidos del estudio, así como los informes con información incompleta.

Fuentes de información y estrategia de búsqueda:

Realizamos una revisión sistemática utilizando Medline / PubMed, Scopus y Web of Sciences. Los términos de búsqueda utilizados fueron "influenza", "influenza aviar", "H5N6", "aves" e "influenza A". Las búsquedas concluyeron el 1 de abril de 2020, y cuatro investigadores diferentes evaluaron de forma independiente los resultados.

Selección de los estudios:

Los resultados de la estrategia de búsqueda inicial se seleccionaron primero por título y resumen. Se examinó el texto completo de los artículos relevantes para los criterios de inclusión y exclusión (Figura 1). Cuando un artículo informó información duplicada del mismo paciente, la información de ambos informes se combinó para obtener datos complementarios, contando como un solo caso. Se incluyeron estudios de observación que informaron la frecuencia de infección por H5N6 en aves para síntesis cuantitativa (meta-análisis).

Proceso de recopilación de datos y elementos de datos:

Los formularios de extracción de datos que incluyen información sobre el tipo de publicación, la institución editorial, el país, el año y la fecha de publicación, así como el número de animales infectados evaluados por RT-PCR fueron llenados independientemente por cuatro investigadores. Un investigador adicional verificó la lista de artículos y las extracciones de datos para asegurarse de que no hubiera artículos duplicados o información duplicada del mismo estudio y también resolvió las discrepancias sobre la inclusión del estudio.

Evaluación de la calidad metodológica y el riesgo de sesgo:

Para evaluar la calidad de los estudios transversales (AXIS), utilizamos la herramienta de evaluación crítica de la Lista de evaluación de la calidad de los estudios de series de casos del Instituto de Economía de la Salud (IHE) (14, 15). El sesgo de publicación se evaluó utilizando un gráfico en embudo. Se usó un modelo de efectos aleatorios para calcular la prevalencia agrupada y el IC del 95%, dados los grados variables de

heterogeneidad de datos y la heterogeneidad inherente en cualquier revisión sistemática de estudios de la literatura publicada. Además, se realizó la prueba de Egger.

Enfoque estadístico:

La discordancia de unidades para las variables se resolvió convirtiendo todas las unidades en una medida estándar. Los porcentajes y las medias \pm desviación estándar (DE) se calcularon para describir las distribuciones de variables categóricas y continuas, respectivamente. Dado que la información del paciente individual no estaba disponible para todos los pacientes, informamos medios ponderados y DE. Los datos de referencia se analizaron con Stata versión 14.0, con licencia de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Los meta-análisis se realizaron con Stata, Open Meta [Analyst] (47) y Comprehensive Meta Analysis ve.3.3® con licencia de la Universidad Tecnológica de Pereira. Las prevalencias agrupadas y sus intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) se usaron para resumir el tamaño del efecto ponderado para cada variable de agrupación de estudio utilizando el modelo binario de efectos aleatorios, teniendo en cuenta el tamaño de la muestra de los estudios individuales. Para la mediana de edad, se aplicó un modelo continuo de efectos aleatorios (procedimiento DerSimonian-Laird) (48, 49). Un modelo de meta-análisis de efectos aleatorios implica la suposición de que los efectos que se estiman en los diferentes estudios no son idénticos, sino que siguen cierta distribución. Para los análisis de efectos aleatorios, la estimación agrupada y los IC del 95% se refieren al centro de la distribución de la prevalencia agrupada, pero no describen el ancho de la distribución. A menudo, la estimación agrupada y su IC del 95% se citan de forma aislada como una estimación alternativa de la cantidad evaluada en un meta-análisis de efectos fijos, lo cual es inapropiado. El IC del 95% de un meta-análisis de efectos aleatorios describe la incertidumbre en la ubicación de la media de prevalencia sistemáticamente diferente en diferentes estudios.

Se estimaron e informaron medidas de heterogeneidad, incluida la estadística Q de Cochran, el índice I² y la prueba de tau cuadrado. Realizamos análisis de subgrupos por técnica, animal y país, y metaanálisis para cada una de las variables de interés.

Resultados y Discusión:

Selección y características del estudio:

Se recuperaron 14.605 artículos utilizando la estrategia de búsqueda; Se seleccionaron 37 artículos para la evaluación de texto completo después de la selección por resumen y título; Se excluyeron 22 artículos por falta de información sobre diagnóstico molecular; y finalmente se incluyeron 15 artículos para el meta-análisis cualitativo y cuantitativo final (Figura 1). La tabla 1 muestra las características principales de los estudios incluidos.

Nuestra revisión incluyó 15 estudios de prevalencia transversal publicados entre el 1 de enero de 2015 y el 1 de abril de 2020, la mayoría de ellos de China (81%), Vietnam (9%), Myanmar (9%) y Bangladesh (3%) (Tablas 1-2), con un total de 13,416 aves evaluadas por RT-PCR. Analizamos cinco variables para los meta-análisis (Tabla 2). El sesgo de publicación se evaluó con un gráfico en embudo para el error estándar por evento logit, sin evidencia de sesgo (Figura S1). Además, la prueba de Egger sugirió que no había evidencia notable de sesgo de publicación ($P = 0.568$).

Características individuales del estudio:

La media de los animales incluidos para RT-PCR por estudio fue de 407, con tasas positivas que varían de 0 a 53.8% (Tablas 1-2).

Principales hallazgos:

La prevalencia de la agrupación de RT-PCR para H5N6 fue de 3,5% (IC 95% 2,8-4,3%) (Figura 2): 39,67% correspondió a patos, con una prevalencia de agrupación de 7,7% (IC 95% 4,4-11,0%) (Figura 3). El 35,63% correspondió a pollos, con una prevalencia

colectiva del 3,3% (IC del 95%: 1,9-4,8); y 19,15% eran aves de corral no especificadas, con un 5,1% de prevalencia en la piscina (IC del 95%: 0,0-14,8%) (Tabla 2) (Figura 3).

Los países de mayor prevalencia, Vietnam y China no mostraron diferencias significativas: Vietnam con 538 animales, y China con 4.212 animales para una prevalencia de grupo del 7,9% (IC95% 4,0-11,7%) y 6,0% (IC95% 4,3-7,8%) respectivamente. Myanmar arrojó 1,3% y Bangladesh 0,4% (Figura 4) (Tabla 2). 2018 fue el año con mayor prevalencia (21,2%), seguido de 2019 (8,3%) y 2020 (5,0%) (Figura 5) (Tabla 2).

Estudios recientes sugieren que los brotes de IAAP 2016-2018, causados por el nuevo virus del clado 2.3.4.4 reordenado, causaron la muerte de mil millones de aves en Corea del Sur (5). En 2020, el clado 2.3.4.4B se informó en Irán después de la secuenciación del genoma completo de veintiocho virus H5Nx que circulaban en el país entre 2016 y 2018 (16). En el mismo año, un estudio informó el primer caso africano del virus HPAI (H5N6) (clado 2.3.4.4b) en un pato de un mercado de aves de corral vivas (LPM) en Nigeria cuyo genoma estaba estrechamente relacionado con el europeo 2017-2018 Virus H5N6 (6). Sin embargo, como se observó en el meta-análisis actual, la mayor carga de prevalencia sigue existiendo en el continente asiático.

Encontramos tasas de prevalencia de infección por H5N6 por RT-PCR de hasta 7.7% (con un límite superior del nivel de confianza de 11.0%) en patos y 3.3% en pollos. Ambas aves comparten un contacto cercano con los seres humanos, especialmente en los LPM asiáticos (17). Los patos juegan un papel fundamental en la preservación y difusión viral en diferentes entornos y entornos. Por lo tanto, el control del H5N6 dentro de las LMP es fundamental para erradicar la influenza de las aves de corral (18, 19). La interacción continua entre humanos y aves de corral en estos entornos plantea un riesgo significativo de infección por contagio humano y posibles amenazas emergentes para la salud de proporciones epidémicas o pandémicas. El aumento de la prevalencia de H5N6 en LPM ha desplazado los esfuerzos de salud pública hacia una vigilancia sostenida de LPM para

recuperar información epidemiológica relevante y proporcionar advertencias tempranas de infección humana con AIV. Las intervenciones como los cierres de LPM deben ejecutarse inmediatamente para reducir el riesgo de infección humana cuando el virus se detecta ampliamente (17).

La influenza H5N6 es solo un ejemplo de un fenómeno sistemático actual: el enfoque completo de la salud pública hacia la enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19) está desviando casi toda la atención de otras enfermedades infecciosas latentes, pero relevantes. Como se observó en nuestro meta-análisis, de 2015 a 2020 ha habido evidencia consistente de tasas de prevalencia de aproximadamente 3% para la influenza H5N6 en aves por RT-PCR.

En 2020, un estudio informó sobre un paciente infectado con el virus de la influenza aviar A (H5N6) por exposición al aerosol en China (20). Ese caso no tenía antecedentes de exposición a LMP, pero tenía un registro de exposición a aves de corral vivas colocadas en un automóvil con puertas y ventanas cerradas. Las muestras recogidas del tracto respiratorio inferior del paciente y la carne de pollo congelada restante fueron positivas para el virus de la influenza A (H5N6) (20). A principios de ese año, se reportó un caso fatal de una niña china obesa de 9 años. Inicialmente presentó fiebre y tos, luego desarrolló neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) e insuficiencia respiratoria. Los aspirados del tracto respiratorio inferior y los hisopos anales se tomaron en serie hasta la muerte del paciente. Se aisló un nuevo virus H5N6 reordenado y se realizó la secuenciación del genoma y el análisis filogenético. Excepto por el gen PA, todos los otros 7 genes del virus pertenecían al genotipo H5N6 A (virus similar a S4) (21). Dados estos casos alarmantes en China, se deben implementar medidas extraordinarias.

Aunque nuestro meta-análisis encontró una prevalencia de grupo del 3,3%, algunos estudios seleccionados alcanzaron tasas de prevalencia de más del 21% (Figura 2). Teniendo en cuenta el número de aves evaluadas, estos hallazgos deben considerarse relevantes.

La preocupación aumenta aún más teniendo en cuenta que no hay vacunas efectivas para prevenir la infección por la gripe H5N6 humana, aunque algunos candidatos han sido probados recientemente (18, 19). Una de ellas, la vacuna rDEVus78HA, protegió eficazmente a los patos contra los desafíos con los virus heterólogos H5N6 y H5N8 aislados (18). Otra vacuna candidata, rMVA-H5, (Registro de ensayos clínicos: NTR3401) parecía ser efectiva contra virus H5 antigénicamente distintos (19).

La prevención primaria es crítica en enfermedades con una alta tasa de letalidad (% CFR), y tal es el caso de muchas HPAI (Bi et al 2016). El virus H5N6 induce grandes pérdidas económicas a las industrias de cría de aves de corral en las regiones en desarrollo de todo el mundo, pero especialmente en Asia. Los virus HPAI H5 clado 2.3.4.4 se introdujeron en Europa a fines de 2014 y se reintrodujeron a fines de 2016, luego de detecciones en Asia y Rusia (22). Se han informado en la provincia de Jiangxi, China, lo que sugiere que la influenza aviar es una amenaza latente importante para la salud pública (23).

Conclusiones y Recomendaciones:

Nuestros resultados destacan la relevancia de las aves individuales como reservorios del H5N6. Los patos y pollos resultaron positivos por RT-PCR en más del 3% de los casos, lo que demuestra su relevancia en el mantenimiento de la transmisión zoonótica con el consiguiente riesgo de brotes de enfermedades. Se debe considerar investigaciones adicionales y un LPM mejorado en China y otros países del mundo, incluyendo los de América Latina.

Se recomienda llevar a cabo estudios de vigilancia epidemiológica, molecular y genómica, en Colombia y en otros países de América Latina, con el fin de detectar tempranamente la introducción de las diferentes cepas de Influenza Aviar, entre ella H5N6.

Agradecimientos:

Se les agradece a Yeimer Holguin-Rivera, Isabella Cortes-Bonilla, María C. Cardona-Trujillo, Alejandra García-Barco, Hugo A. Bedoya-Arias, Leidy Jhoana Patiño-Cadavid, Mateo Aguirre-Florez, Graciela J. Balbin-Ramon, Luis Perez-Garcia, Alberto Paniz-Mondolfi, quienes apoyaron en el desarrollo de esta investigación.

Bibliografía:

1. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Taxonomía de virus: la base de datos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Investigación de ácidos nucleicos. 2018; 46 (D1): D708-d17.
2. Dhingra MS, Artois J, Dellicour S, Lemey P, Dauphin G, Von Dobschuetz S, et al. Patrones geográficos e históricos en las emergencias de los nuevos virus H5 y H7 de la influenza aviar altamente patógena (HPAI) en aves de corral. Fronteras en veterinaria. 2018; 5: 84.
3. Bi Y, Chen Q, Wang Q, Chen J, Jin T, Wong G, et al. Génesis, evolución y prevalencia de los virus de la influenza aviar H5N6 en China. Célula huésped y microbio. 2016; 20 (6): 810-21.
4. Yamaji R, Saad MD, Davis CT, Swayne DE, Wang D, Wong FYK, et al. Potencial pandémico de los virus de la influenza aviar altamente patógena clade 2.3.4.4 A (H5). Rev Med Virol. 2020: e2099.
5. Shin J, Kang S, Byeon H, Cho SM, Kim SY, Chung YJ, et al. Subtipo del virus de la influenza aviar H5N6 altamente patógeno clado 2.3.4.4 indígena en Corea del Sur. Sci Rep. 2020; 10 (1): 7241.
6. Shittu I, Bianco A, Gado D, Mkpuma N, Sulaiman L, Laleye A, et al. Primera detección del virus de la influenza aviar H5N6 altamente patógena en el continente africano. Emerg Microbios Infect. 2020: 1-14.
7. Swayne DE, Hill RE, Clifford J. Aplicación segura de la regionalización para el comercio de aves y productos avícolas durante brotes de influenza aviar altamente

patógena en los Estados Unidos. Patología aviar: revista de la WVPA. 2017; 46 (2): 125-30.

8. García M, Suárez DL, Crawford JM, Latimer JW, Slemons RD, Swayne DE, et al. Evolución de los virus H5 subtipo de influenza aviar A en América del Norte. Investigación de virus. 1997; 51 (2): 115-24.

9. Shen H, Wu B, Chen Y, Bi Y, Xie Q. Reordenamiento del virus de la influenza A (H5N6), sur de China, 2014. Enfermedades infecciosas emergentes. 2015; 21 (7): 1261-2.

10. Wong FY, Phommachanh P, Kalpravidh W, Chanthavisouk C, Gilbert J, Bingham J, et al. Virus de influenza A (H5N6) altamente patógeno reagrupado en Laos. Enfermedades infecciosas emergentes. 2015; 21 (3): 511-6.

11. Pan M, Gao R, Lv Q, Huang S, Zhou Z, Yang L, et al. Infección humana con un nuevo virus de la influenza aviar altamente patógena A (H5N6): hallazgos virológicos y clínicos. Revista de infección. 2016; 72 (1): 52-9.

12. Organización Mundial de la Salud. Infección humana con virus de la gripe aviar A (H5): OMS; 2020 [citado 2020 23/03/2020]. Disponible en: https://www.who.int/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai-20200313.pdf?sfvrsn=223ca73f_42.

13. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Grupo P. Elementos de informes preferidos para revisiones sistemáticas y meta-análisis: la declaración PRISMA. PLoS Med. 2009; 6 (7): e1000097.

14. Instituto de Economía de la Salud (IHE). Evaluación de calidad de la lista de verificación de estudios de series de casos Edmonton (AB): Instituto de Economía de la Salud; 2014 [Disponible en: <http://www.ihe.ca/research-programs/rmd/cssqac/cssqac-about>].

15. Downes MJ, Brennan ML, Williams HC, Dean RS. Desarrollo de una herramienta de evaluación crítica para evaluar la calidad de los estudios transversales (AXIS). BMJ Open. 2016; 6 (12): e011458.

16. Abdollahi H, Ali ASM, Monne I, Milani A, Habibi M, Zamperin G, et al. Propagación espacial y aparición de virus de influenza aviar altamente patógena H5 reagrupados en Irán Virus de influenza aviar altamente patógena H5 reagrupada en Irán. *Infectar Genet Evol.* 2020: 104342.
17. Fang S, Bai T, Yang L, Wang X, Peng B, Liu H, et al. La vigilancia sostenida del mercado de aves de corral vivas contribuye a las alertas tempranas de infección humana con virus de influenza aviar. *Emerg Microbios Infect.* 2016; 5 (8): e79.
18. Chen P, Ding L, Jiang Y, Zeng X, Deng G, Shi J, et al. Eficacia protectora en patos de cría de una vacuna vectorizada con virus de enteritis de pato contra los virus de la gripe aviar H5N1, H5N6 y H5N8. *Vacuna.* 2019; 37 (40): 5925-9.
19. de Vries RD, Altenburg AF, Nieuwkoop NJ, de Bruin E, van Trierum SE, Pronk MR, et al. Inducción de anticuerpos cruzados y respuestas de células T por una vacuna de virus de la vacuna modificada basada en Ankara Influenza A (H5N1) en un ensayo clínico aleatorizado de fase 1 / 2a. *J Infect Dis.* 2018; 218 (4): 614-23.
20. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Infecciones por coronavirus y respuestas inmunes. *J Med Virol.* 2020; 92 (4): 424-32.
21. Chen LL, Huo X, Qi X, Liu C, Huang H, Yu H, et al. Un caso pediátrico mortal infectado con el virus de la influenza aviar A (H5N6) en el este de China. *Transbound Emerg Dis.* 2020.
22. Poen MJ, Venkatesh D, Bestebroer TM, Vuong O, Scheuer RD, Oude Munnink BB, et al. Cocirculación de virus de la influenza aviar altamente patógena A clade 2.3.4.4 (H5N6) genéticamente distintos en aves acuáticas y aves silvestres en Europa y Asia oriental, 2017-18. *Virus Evol.* 2019; 5 (1): vez004.
23. Li M, Feng S, Lv S, Luo J, Guo J, Sun J, et al. Brote de virus de influenza aviar H5N6 altamente patógeno en *Pavo cristatus* en la provincia de Jiangxi, China. *Emerg Microbios Infect.* 2019; 8 (1): 377-80.
24. Chen LJ, Lin XD, Guo WP, Tian JH, Wang W, Ying XH, et al. Diversidad y evolución de los virus de la gripe aviar en los mercados de aves de corral vivas, aves de corral y aves de humedales salvajes en China. *J Gen Virol.* 2016; 97 (4): 844-54.

25. Tun Win Y, Gardner E, Hadrill D, Su Mon CC, Kyin MM, Maw MT, et al. Detección emergente del virus de la influenza A zoonótica en Myanmar: prácticas de vigilancia y hallazgos. *Health Secur.* 2017; 15 (5): 483-93.
26. Chen LJ, Lin XD, Tian JH, Liao Y, Ying XH, Shao JW, et al. Diversidad, evolución y dinámica de la población de los virus de la gripe aviar que circulan en los mercados de aves de corral vivas en China. *Virología.* 2017; 505: 33-41.
27. Kang Y, Liu L, Feng M, Yuan R, Huang C, Tan Y, et al. Virus de la influenza A H5N6 altamente patógenos recuperados de aves silvestres en Guangdong, sur de China, 2014-2015. *Sci Rep.* 2017; 7: 44410.
28. Nguyen DT, Jang Y, Nguyen TD, Jones J, Shepard SS, Yang H, et al. Distribución de clados cambiantes, reordenamiento y aparición de nuevos subtipos de virus de la influenza aviar altamente patógena A (H5) recolectados de aves de corral vietnamitas de 2012 a 2015. *J Virol.* 2017; 91 (5).
29. Zhang T, Li R, Zhu G, Chang J, Xu B. Primera detección de un nuevo virus del virus de la influenza aviar A (H5N6) Reasortant Clade 2.3.2.1c, aislado de un pájaro salvaje en China. *Anuncio de recursos de Microbiol.* 2019; 8 (36).
30. Chu DH, Okamatsu M, Matsuno K, Hiono T, Ogasawara K, Nguyen LT, et al. Caracterización genética y antigénica de los virus de influenza aviar H5, H6 y H9 que circulan en los mercados de aves vivas con intervención en la parte central de Vietnam. *Veterinario Microbiol.* 2016; 192: 194-203.
31. Sealy JE, Fournie G, Trang PH, Dang NH, Sadeyen JR, Thanh TL, et al. Comportamientos del comercio de aves de corral en los mercados vietnamitas de aves vivas como factores de riesgo de infección por influenza aviar en pollos. *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66 (6): 2507-16.
32. He G, Zhou L, Zhu C, Shi H, Li X, Wu D, et al. Identificación de dos nuevos virus de influenza aviar a (H5N6) en aves silvestres, Shanghai, en 2016. *Vet Microbiol.* 2017; 208: 53-7.
33. Lu S, Zhao Z, Zhang J, Wang W, He X, Yu M, et al. Genética, patogenicidad y transmisibilidad de los nuevos virus de influenza aviar altamente patógenos H5N6

reagrupados, primero aislados de aves migratorias en el oeste de China. *Emerg Microbios Infect.* 2018; 7 (1): 6.

34. Yu Z, Gao X, Wang T, Li Y, Li Y, Xu Y, et al. Infección fatal por el virus de la influenza aviar H5N6 en un gato doméstico y aves silvestres en China. *Sci Rep.* 2015; 5: 10704.

35. Yang G, Chowdury S, Hodges E, Rahman MZ, Jang Y, Hossain ME, et al. Detección de virus de la influenza aviar altamente patógena A (H5N6) en aves acuáticas en Bangladesh. *Virología.* 2019; 534: 36-44.

36. Zhao T, Qian YH, Chen SH, Wang GL, Wu MN, Huang Y, et al. Nuevos virus H7N2 y H5N6 de la influenza aviar A en pollos centinela: un estudio de vigilancia centinela de pollo. *Frente Microbiol.* 2016; 7: 1766.

37. Sun J, Zhao L, Li X, Meng W, Chu D, Yang X, et al. Novedosos reagrupamientos del virus de la influenza aviar H5N6 con H5N8 europeo aislado en aves migratorias, China. *Transbound Emerg Dis.* 2020; 67 (2): 648-60.

Anexos:

Figura 1. Selección de estudio y características.

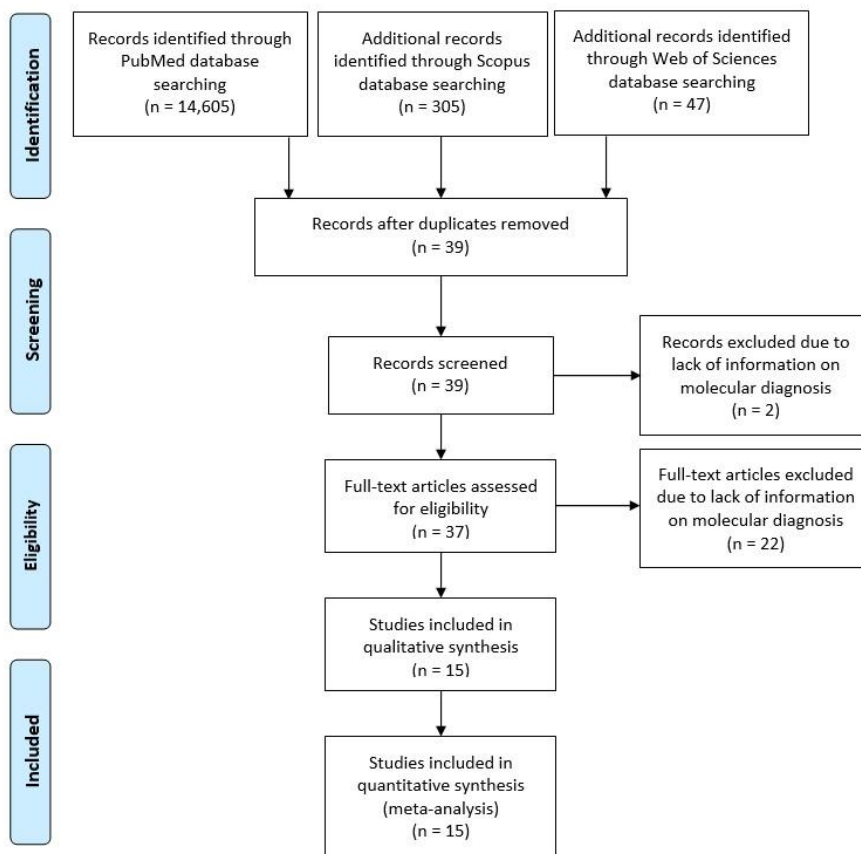
**PRISMA 2009 Flow Diagram**

Figura 2. Gráfico de árbol del meta-análisis de prevalencia agrupada de la infección por H5N6 en aves.

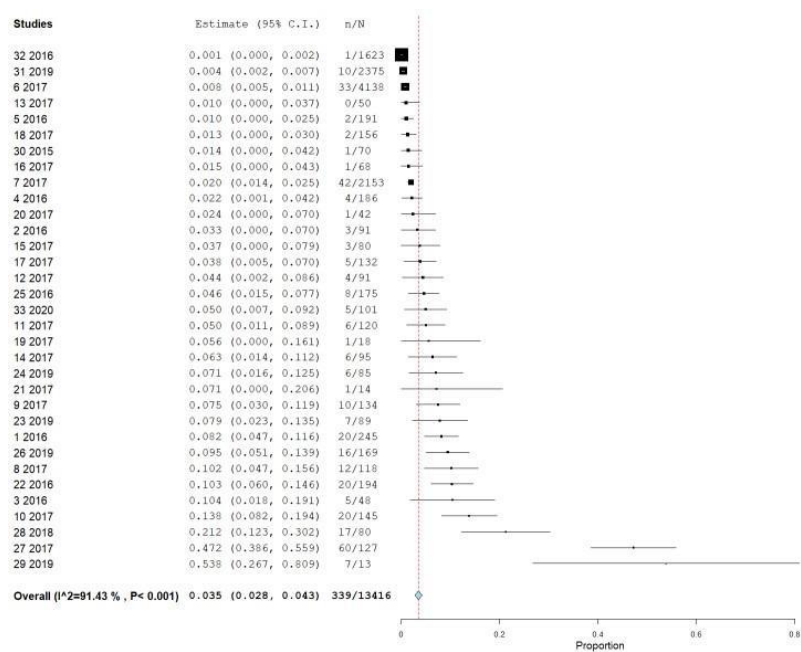


Figura 3. Gráfico de árbol del meta-análisis de prevalencia agrupada de la infección por H5N6 en aves, por grupos de aves.

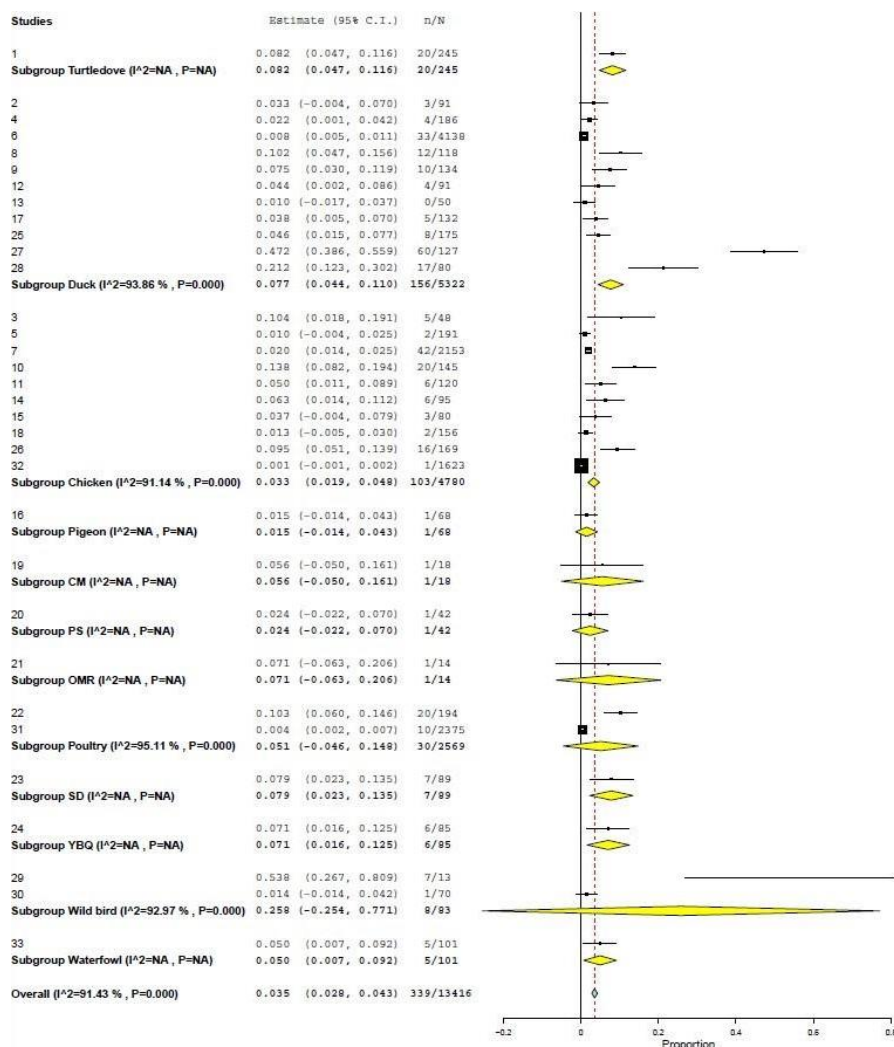


Figura 4. Gráfico de árbol del meta-análisis de prevalencia agrupada de la infección por H5N6 en aves, por países.

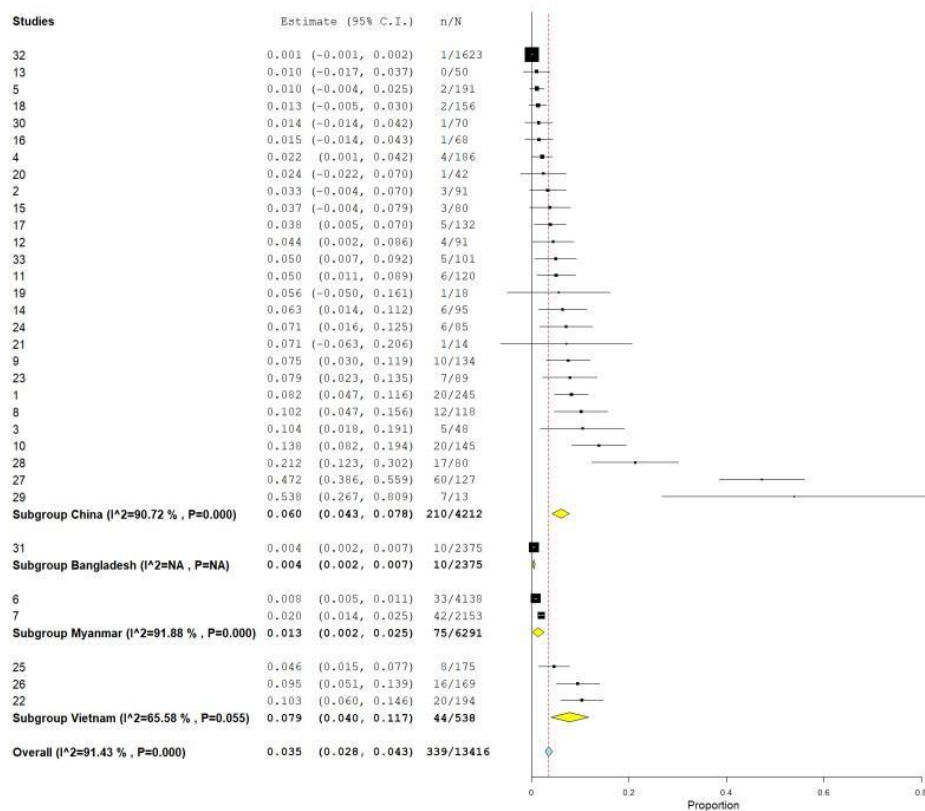


Figura 5. Gráfico de árbol del meta-análisis de prevalencia agrupada de la infección por H5N6 en aves, por años.

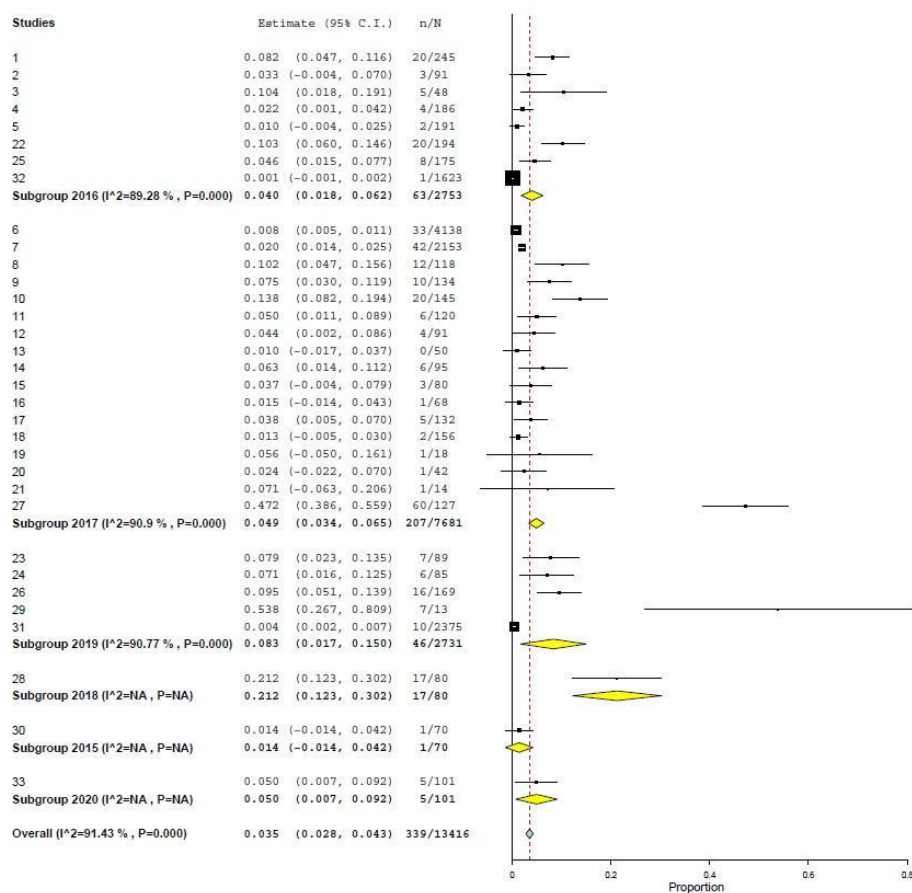


Tabla 1. Características de los estudios incluidos sobre H5N1 en aves.

Título Estudio	Año de publicación		País	Lugar	Aves Evaluadas	Muestra	N	n		Referencia
	Año de	estudio						(+)	%	
Diversidad y evolución de los virus de la gripe aviar en los mercados de aves de corral vivas, aves de corral y aves de humedales salvajes en China	2016	2014 - 2015	China	Hubei	Turtledove	Fecal	245	20	8.2	(24)
	2016	2014 - 2015	China	Hubei	Duck	Fecal	91	3	3.3	
	2016	2014 - 2015	China	Hubei	Chicken	Fecal	48	5	10.4	
	2016	2014 - 2015	China	Zhejiang	Duck	Fecal	186	4	2.2	
	2016	2014 - 2015	China	Zhejiang	Chicken	Fecal	191	2	1.0	
Emergente Zoonotic Detección del virus de la influenza A en Myanmar: prácticas de vigilancia y hallazgos	2017	2014 - 2016	Myanmar	N / A	Pato	Orofaringeo	4138	33	0.8	(25)
	2017	2014 - 2016	Myanmar	N / A	Pollo	Orofaringeo	2153	42	2.0	
Diversidad, evolución y dinámica de la población de los virus de la gripe aviar circulando en los mercados de aves de corral vivas en China	2017	2014 - 2015	China	Hubei	Duck	Fecal	118	12	10.2	(26)
	2017	2014 - 2015	China	Hubei	Duck	Cloacal	134	10	7.5	
	2017	2014 - 2015	China	Hubei	Chicken	Fecal	145	20	1 3.8	
	2017	2014 - 2015	China	Hubei	Chicken	Cloacal	120	6	5.0	
	2017	2014 - 2015	China	Zhejiang	Duck	Fecal	91	4	4.4	
	2017	2014 - 2015	China	Zhejiang	Duck	Cloacal	50	0	0.0	
	2017	2014 - 2015	China	Zhejiang	Chicken	Fecal	95	6	6.3	
	2017	2013 - 2015	China	Zhejiang	Chicken	Cloacal	80	3	3.8	
	2017	2014 - 2015	China	Zhejiang	Pigeon	Cloacal	68	1	1.5	
	2017	2014 - 2015	China	Jiangxi	Duck	Fecal	132	5	3.8	
	2017	2014 - 2015	China	Jiangxi	Chicken	Fecal	156	2	1.3	
	2017	2014 - 2015	China	Guandong	CM	Fecal	18	1	5.6	
	2017	2014 - 2015	China	Guandong	PS	Fecal	42	1	2.4	
Influenza H5N6 altamente patógena A virus recuperados de aves silvestres en Guangdong, sur de China, 2014–2015	2017	2014 - 2015	China	Guandong	OMR	Fecal	14	1	7.1	(27)
	2017	2014 - 2015	China	Guandong	PS	Fecal	42	1	2.4	
	2017	2014 - 2015	China	Guandong	OMR	Fecal	14	1	7.1	
Distribución del clado cambiante, reordenamiento, y aparición de nuevos subtipos de virus de la influenza aviar altamente patógena A (H5) recolectados de aves de corral vietnamitas de 2012 a 2015	2016	2012 - 2015	Vietnam	Vietnam	Aves de corral	orofaringeas	194	20	10.3	(28)
Primera detección de un nuevo aviar reagrupado en virus de la gripe A (H5N6) Clade 2.3.2.1c, aislado de un ave salvaje en China	2019	2016	China	N / A	SD	Fecal	89	7	7.9	(29)
	2019	2016	China	N / A	YBQ	Fecal	85	6	7.1	
Caracterización genética y antigénica de H5 , Virus de la gripe aviar H6 y H9 que circulan en los mercados de aves vivas con intervención en la parte central de Vietnam	2016	2014	Vietnam	Thua Thien Hue	Duck	Fecal	175	8	4.6	(30)
Comportamientos del comercio de aves de corral en los mercados vietnamitas de aves vivas como factores de riesgo para la infección por influenza aviar en pollos	2019	2017	Vietnam	norte de Vietnam	Pollo	Orofaringeo	169	16	9.5	(31)

Identificación de dos nuevos virus de influenza aviar a (H5N6) en aves silvestres, Shanghai, en 2016	2017	2016	China	Shanghai: Chongming Dongtan, Nanhui Dongtan, Jiuduansha Changshantou	Duck	CTS	127	60	47.2	(32)
Genética, patogenicidad y transmisibilidad de los nuevos virus de influenza aviar altamente patógenos H5N6 reagrupados aislados por primera vez de aves migratorias en el oeste de China	2018	2015	China	Changshantou	Duck	OCS	80	17	21.3	(33)
Primera detección de un noviembre El Reordenamiento de la Influenza Aviar A (H5N6) Clade 2.3.2.1c Virus, aislado de un ave silvestre en China	2019	2016	China	Suichuan County Aves	silvestres	TCS	13	7	53.8	(29)
Infección fatal por el virus de la influenza aviar H5N6 en un gato doméstico y aves silvestres en China	2015	2014	China	Provincia de Sichuan	Aves silvestres	Heces	70	1	1.4	(34)
Detección de virus de la influenza aviar altamente patógena A (H5N6) en aves acuáticas en Bangladesh	2019	2016-2017	Bangladesh		Aves de corral	TCS	2375	10	0.4	(35)
Novela H7N2 y H5N6 Influenza aviar A virus en pollos centinelas: un estudio de vigilancia de pollos centinela	2016	2014	China	Jiangsu Province	Chicken	CTS	1623	1	0.1	(36)
Novela H5N6 Reasortantes del virus de la influenza aviar con H5N8 europeo aislado en aves migratorias, China	2020	2017	China	Ningxia Región autónoma Hui	Aves acuáticas	OCS	101	5	5.0	(37)

CM, gallinero común. PD: la sandgrouse de Pallas. OMR, urraca oriental. SD, Streptopelia decaocto. YBQ, codorniz de patas amarillas. CTS, hisopo cloacal y traqueal. OCS, hisopos orofaríngeos y cloacales. TCS, hisopo traqueal y cloacal. N / A. No disponible o reportado.

Tabla 2. Resultados del meta-análisis (modelo de efectos aleatorios) *.

Subgrupos	número de estudios	piscina Prevalencia (%)	IC 95%	n	Q [†]	I ² [‡]	t ² [§]	p
todos los estudios	15	3.5	2.8 a 4.3	13,416	373,460	91,431	0,001	<0,001
avesde agrupación	4.4-							
Patos	11.0126,786	7,7		5.322	11 101.601A	93,86	0,001	<0,001
Pollos	10	3.3	1.9-4.8	4,780	ves	91.14	0.001	<0.001
no especificadas	2	5.1	0.0-14.8	2,569	20.439	95.11	0.001	<0.001
Países								
Vietnam	3	7.9	4.0-11.7	538	5.811	65.58	0.100	0.05
China	28	6.0	4.3-7.8	4,212	298.457	90.72	0.001	< 0.001
Myanmar	2	1.3	0.2-2.5	6,291	12.320	91.88	0.001	<0.001
Años								
2019	5	8.3	1.7-15.0	2,731	43.323	90.77	0.001	<0.001
2017	17	4.9	3.4-6.5	7,681	175.786	90.9	0.001	<0.001
2016	8	4.0	1.8-6.2	2,753	65.279	89.28	0.001	<0.001

* IC 95% = intervalo de confianza del 95%. † Estadística Q de Cochran para heterogeneidad. ‡I² Índice para el grado de heterogeneidad. § Medida de heterogeneidad de tau cuadrado.

Materiales suplementarios

Figura S1. Gráfico de embudo para la tasa de error estándar por evento logit para evaluar el sesgo de publicación.

